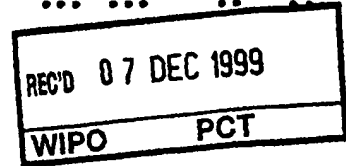


BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



EP 99/8169

Bescheinigung

Die BASF Aktiengesellschaft in Ludwigshafen/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

„Substituierte 2-Phenylbenzimidazole, deren Herstellung und Anwendung“

am 1. März 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol C 07 D 235/18 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 2. November 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Hof

Aktenzeichen: 199 08 733.4

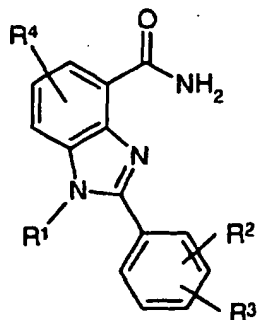
PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Patentansprüche

1. Verbindungen der allgemeinen Formel I

5

10



worin

15

R¹ Wasserstoff, verzweigtes und unverzweigtes C₁-C₆-A
wobei ein C-Atom des Alkyl-Restes noch OR¹¹ oder e
Gruppe R⁵ tragen kann, wobei

20

R¹¹ Wasserstoff oder C₁-C₄-Alkyl bedeutet, und

R² Wasserstoff, Chlor, Fluor, Brom, Iod, verzweigtes
unverzweigtes C₁-C₆-Alkyl, Nitro, CF₃, CN, NR²¹R²²,
NH-CO-R²³, OR²¹, wobei

25

R²¹ und R²² unabhängig voneinander Wasserstoff oder
C₁-C₄-Alkyl bedeuten und

30

R²³ Wasserstoff, C₁-C₄-Alkyl oder Phenyl bedeuten, und

R³ -O-(CH₂)_o-(CHR³¹)_m-(CH₂)_n-R⁵, wobei

R³¹ Wasserstoff, C₁-C₄-Alkyl, OH und O-C₁-C₄-Alkyl,

35

m, o unabhängig voneinander 0, 1 oder 2 bedeutet, und

n 1, 2, 3 oder 4 bedeutet, und

40

R⁴ Wasserstoff, verzweigtes und unverzweigtes C₁-C₆-A
Chlor, Brom Fluor, Nitro, Cyano, NR⁴¹R⁴², NH-CO-R⁴³,
wobei

R⁴¹ und R⁴² unabhängig voneinander Wasserstoff oder
C₁-C₄-Alkyl bedeuten und

45

99

lkyl,
ine

und

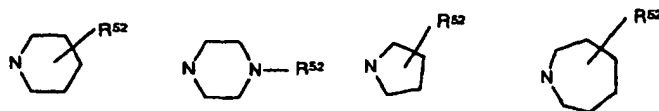
lkyl,
, OR41,

2 15 11 99

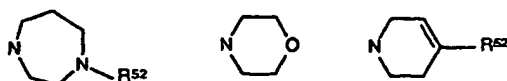
R⁴³ C₁-C₄-Alkyl oder Phenyl bedeuten, und

R⁵ NR⁵¹R⁵² oder einen der folgenden Reste

5



10



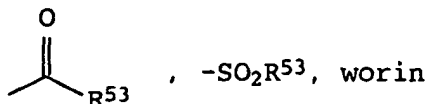
bedeutet, wobei

15

~~R⁵¹ Wasserstoff und verzweigtes und unverzweigtes C₁-C₆-Alkyl~~
bedeutet und

R⁵² Wasserstoff, verzweigtes und unverzweigtes C₁-C₆-Alkyl,
Phenyl,

20



25

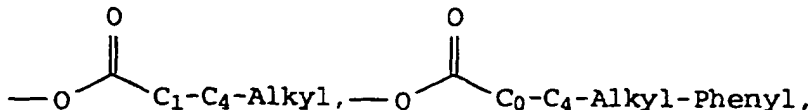
R⁵³ verzweigtes oder unverzweigtes O-C₁-C₆-Alkyl, Phenyl,
verzweigtes oder unverzweigtes C₁-C₄-Alkyl-Phenyl,
wobei bei R⁵² und R⁵³ unabhängig voneinander ein Wasser-
stoff des C₁-C₆-Alkylrests durch einen der folgenden

30

Reste substituiert sein kann: OH, O-C₁-C₄-Alkyl, Cyclo-
hexyl, Cyclopentyl, Tetrahydronaphthyl, Cyclopropyl,
Cyclobutyl, Cycloheptyl, Naphthyl und Phenyl, wobei
die Carbocyclen der Reste R⁵² und R⁵³ unabhängig vonein-
ander noch einen oder zwei der folgenden Reste tragen
können: verzweigtes oder unverzweigtes C₁-C₆-Alkyl, ver-
zweigtes oder unverzweigtes O-C₁-C₄-Alkyl, OH, F, Cl, Br,
J, CF₃, NO₂, NH₂, CN, COOH, COOC₁-C₄-Alkyl, C₁-C₄-Alkyl-
amino, CCl₃, C₁-C₄-Dialkylamino, SO₂-C₁-C₄-
Alkyl, SO₂Phenyl, CONH₂, CONH-C₁-C₄-Alkyl, CONHPhenyl,
CONH-C₁-C₄-Alkyl-Phenyl, NHSO₂-C₁-C₄-Alkyl, NHSO₂Phenyl,
S-C₁-C₄-Alkyl,

35

40



45

CHO, CH₂-O-C₁-C₄-Alkyl, -CH₂O-C₁-C₄-Alkyl-Phenyl, -CH₂OH,
-SO-C₁-C₄-Alkyl, -SO-C₁-C₄-Alkyl-Phenyl, -SO₂NH₂, -SO₂NH-
C₁-C₄-Alkyl

und zwei Reste eine Brücke -O-(CH₂)_{1,2}-O- bilden,
bedeuten kann,

sowie ihre tautomeren Formen, möglichen enantiomeren und diastereomeren Formen, deren Prodrugs, sowie mögliche physiologisch verträgliche Salze.

- 5 2. Verbindungen nach Anspruch 1, wobei R² in 3-Position und R³ in 4-Position oder R² in 4-Position und R³ in 3-Position zum Benzimidazolring steht.
3. Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei
10 R¹, R² und R⁴ Wasserstoff bedeuten.
4. Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei R² Wasserstoff, verzweigtes oder unverzweigtes C₁-C₆-Alkyl, Nitro, CN, NH₂, O-C₁-C₄-Alkyl bedeutet.
-
- 15 5. Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei R³ -O-(CH₂)_p-R⁵ mit p gleich 2, 3 oder 4 bedeutet.
6. Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei R⁵ einen
20 6-gliedrigen Ring und R⁵² einen gegebenenfalls substituierten Phenylring bedeutet.
7. Arzneimittel, enthaltend neben den üblichen Träger und Hilfsstoffen eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 6.
- 25 8. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Krankheiten, bei denen pathologisch erhöhte Aktivitäten von PARP auftreten.
- 30 9. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von neurodegenerativen Krankheiten und neuronalen Schädigungen.
- 35 10. Verwendung nach Anspruch 9 zur Behandlung von solchen neurodegenerativen Krankheiten und neuronalen Schädigungen, die durch Ischämie, Trauma oder Massenblutungen ausgelöst werden.
- 40 11. Verwendung nach Anspruch 10 zur Behandlung des Schlaganfalls und des Schädel-Hirntraumas.
- 45 12. Verwendung nach Anspruch 10 zur Behandlung der Alzheimerschen Krankheit, der Parkinsonsche Krankheit und der Huntington-Krankheit.

13. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung oder Prophylaxe von Schädigungen durch Ischämien.
- 5 14. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Epilepsien, insbesondere von generalisierten epileptischen Anfällen, wie zum Beispiel Petit mal und tonisch-clonische Anfälle, und partiell epileptischen Anfällen, wie Temporal Lope, und komplex-partiellen Anfällen.
- 10 15. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung von Arzneimitteln zur ~~Behandlung von Schädigungen der Nieren nach renalen Ischämien~~ und zur Behandlung während und nach Nierentransplantationen.
- 15 16. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Schädigungen des Herzens nach cardialen Ischämien.
- 20 17. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Mikroinfarkten, wie zum Beispiel während und nach Herzklappenersatz, Aneurysmenresektionen und Herztransplantationen.
- 25 18. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung bei einer Revascularisation kritischer verengter Koronararterien, wie zum Beispiel bei PTCA und Bypass-Operationen, oder kritisch verengter peripherer Arterien, insbesondere Beinarterien.
- 30 19. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung des akuten Myocardinfarktes und von Schädigungen während und nach dessen medikamentöser oder mechanischer Lyse.
- 40 20. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Tumoren und deren Metastasierung.

21. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Sepsis und des septischen Schocks.
- 5 22. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von immunologischen Krankheiten wie Entzündungen und rheumatische Erkrankungen, wie zum Beispiel rheumatoide Arthritis.
- 10 23. In vitro Nachweisverfahren für PARP-Inhibitoren, dadurch gekennzeichnet, daß man
-
- 15 a) ~~ein ungeträgertes oder geträgertes Poly-ADP-ribosylier-~~
bares Target mit einem Reaktionsgemisch inkubiert,
umfassend
a1) ein PARP,
a2) einen PARP-Aktivator; und
a3) einen PARP-Inhibitor oder einen Analyten, in welchem
20 man wenigstens einen PARP-Inhibitor vermutet;
b) die Poly-ADP-Ribosylierungsreaktion durchführt; und
c) die Poly-ADP-Ribosylierung des Target qualitativ oder
quantitativ mit einem Anti-Poly-(ADP-ribose)-Antikörper
bestimmt.
- 25 24. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß man
PARP mit dem PARP-Aktivator und dem PARP-Inhibitor oder einen
Analyten, in welchem man wenigstens einen PARP-Inhibitor ver-
mutet, vorinkubiert, bevor man die Poly-ADP-Ribosylierungs-
30 reaktion durchführt.
- 25 25. Verfahren nach einem der Ansprüche 23 oder 24, dadurch
gekennzeichnet, daß das Poly-ADP-ribosylierbare Target ein
Histon-Protein ist.
- 35 26. Verfahren nach einem der Ansprüche 23 bis 25, dadurch gekenn-
zeichnet, daß der PARP-Aktivator aktivierte DNA ist.
- 40 27. Verfahren nach einem der Ansprüche 23 bis 26, dadurch gekenn-
zeichnet, daß man die Poly-ADP-Ribosylierungsreaktion durch
Zugabe von NAD⁺ startet.
- 45 28. Verfahren nach einem der Ansprüche 23 bis 27, dadurch gekenn-
zeichnet, daß das nichtgeträgerte Target mit einem Akzeptor-
Fluorophor markiert ist.

29. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß man die Poly-ADP-Ribosylierung des nicht geträgerten Target mit Anti-Poly-(ADP-ribose)-Antikörper bestimmt, der mit einem Donor-Fluorophor markiert ist, das zur Energieübertragung auf das Akzeptor-Fluorophor befähigt ist.

30. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 und 29, dadurch gekennzeichnet, daß das Target biotinyliertes Histon ist und das Akzeptor-Fluorophor über Avidin oder Streptavidin daran gekoppelt ist.

31. Verfahren nach einem der Ansprüche 29 und 30, dadurch gekennzeichnet, daß der Anti-Poly-(ADP-ribose)-Antikörper ein Europium-Kryptat als Donor-Fluorophor trägt

15

20

25

30

35

40

45

Substituierte 2-Phenylbenzimidazole, deren Herstellung und Anwendung

5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft neuartige 2-Phenylbenzimidazole, ihre Herstellung und die Verwendung als Inhibitoren des Enzyms Poly(ADP-ribose)polymerase oder PARP (EC 2.4.2.30)

10 zur Herstellung von Arzneimitteln.

Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP), bzw. wie es auch genannt wird Poly(ADP-ribose)synthase (PARS), stellt ein regulatorisches Enzym dar, das in Zellkernen gefunden wird (K. Ikai et al.

- 15 *J. Histochem. Cytochem.* 1983, 31, 1261-1264). Man nimmt an, daß PARP eine Rolle bei der Reparatur von DNA-Brüchen spielt (M.S. Satoh et al., *Nature* 1992, 356, 356-358). Schädigungen oder Brüche der DNA-Stränge aktivieren das Enzym PARP, das, wenn es aktiviert ist, die Übertragung von ADP-Ribose aus NAD kataly-
- 20 siert (S. Shaw, *Adv. Radiat. Biol.*, 1984, 11, 1-69). Dabei wird Nikotinamid aus NAD freigesetzt. Nikotinamid wird unter Verbrauch des Energieträgers ATP von anderen Enzymen wieder in NAD umgewandelt. Eine Überaktivierung von PARP hätte dementsprechend einen unphysiologisch hohen Verbrauch von ATP zur Folge und
- 25 dies führt im Extremfall zu Zellschädigungen und Zelltod.

- Es ist bekannt, daß Radikale wie Superoxid-Anion, NO und Wasserstoffperoxid in Zellen zu DNA-Schädigungen führen können und damit PARP aktivieren. Die Bildung von großen Mengen an Radikalen
- 30 wird bei einer Reihe von pathophysiologischen Zuständen beobachtet und man geht davon aus, daß diese Anhäufung von Radikalen zu den beobachteten Zell- bzw. Organschäden führen oder beitragen. Dazu zählt von zum Beispiel ischämische Zustände von Organen wie im Schlaganfall, Herzinfarkt (C. Thiernemann et al., *Proc. Natl.*
- 35 *Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 679-683) oder Ischämie der Nieren, aber auch Reperfusionsschäden wie sie zum Beispiel nach der Lyse von Herzinfarkt auftreten (s. oben: C. Thiernemann et al.). Die Hemmung von dem Enzym PARP könnte demzufolge ein Mittel sein, um diese Schäden mindestens zum Teil zu verhindern oder abzu-
- 40 mildern. PARP-Inhibitoren könnten somit ein neues Therapieprinzip zur Behandlung von einer Reihe von Krankheiten darstellen.

- Das Enzym PARP beeinflusst die Reparatur von DNA-Schäden und könnte somit auch in der Therapie von Krebs-Erkrankungen
- 45 eine Rolle spielen, da in Kombination mit cytostatisch wirksamen Stoffen ein höheres Wirkpotential gegenüber Tumorgewebe

beobachtet wurde (G. Chen et al. *Cancer Chemo. Pharmacol.* 1988, 22, 303).

Nicht limitierende Beispiele für Tumoren sind Leukämie, Glioblastome, Lymphome, Melanome, Mama- und Cervixkarzinome.

Zudem wurde gefunden, daß PARP-Inhibitoren immunsuppressive Wirkung zeigen können (D. Weltin et al. *Int. J. Immunopharmacol.* 1995, 17, 265-271).

10

Es wurde ebenfalls entdeckt, daß PARP bei immunologischen Erkrankungen bzw. Krankheiten, in denen das Immunsystem eine wichtige Rolle spielt, wie zum Beispiel rheumatoide Arthritis und septischer Schock, involviert ist, und daß PARP-Inhibitoren

15 einen günstigen Effekt auf den Krankheitsverlauf zeigen können (H. Kröger et al. *Inflammation* 1996, 20, 203-215; W. Ehrlich et al. *Rheumatol. Int.* 1995, 15, 171-172; C. Szabo et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 3867-3872; S. Cuzzocrea et al. *Eur. J. Pharmacol.* 1998, 342, 67-76).

20

Unter PARP im Sinne dieser Erfindung werden auch Isoenzyme des oben beschriebenen PARP-Enzyms verstanden.

Weiterhin zeigte der PARP-Inhibitor 3-Aminobenzamid protektive

25 Effekte in einem Model für den Kreislaufschock (S. Cuzzocrea et al., *Br. J. Pharmacol.* 1997, 121, 1065-1074).

2-Phenylbenzimidazole sind vielfach beschrieben worden. So sind in DE 38 30 060 alkylierte Derivate als Inhibitoren

30 der Erythrozytenaggregation offengelegt. In DE 35 22 230 ist ein Ester-Derivat vom 2-Phenylbenzimidazol als Inhibitor der Plättchenaggregation aufgeführt. Halogen-substituierte 2-Phenylbenzimidazole, die am Phenyl-Ring substituierte Amin-Reste tragen, sind in WO 98/06703 als MCP-1-Antagonisten beschrieben worden.

35

Ebenfalls sind 2-Phenyl-benzimidazole bekannt, bei denen die Benzimidazol-Gruppe durch eine Amid-Gruppe substituiert ist. 5-Amido-Derivate des 2-Phenylbenzimidazols, die am Phenyl-Ring Alkyloxy-Reste tragen, sind in WO 94/12461 als Inhibitoren der

40 cAMP-Phosphodiesterase beschrieben worden. Für analoge Derivate wurde in DE 35 46 575 (z.B. Beispiel 15) gefunden, daß diese Verbindungen positiv inotrope Effekte auslösen. Ebenfalls 4-Amido-Derivate, die in 3-Stellung einen Pyridyl-Rest tragen, sind in WO 97/48697 als Inhibitoren der cAMP-Phosphodiesterase

45 aufgeführt.

Die Synthese von 2-Phenyl-benzimidazol-4-amiden ist in J. Chem. Soc. Perkin Trans 1, 1979, 2303-2307, beschrieben worden. Analoge Verbindungen, die am Amid-Rest noch eine substituierte Alkyl-Kette tragen, und die cytotoxische Wirkung haben sollen, sind in 5 J. Med. Chem. 1990, 33, 814-819, aufgeführt. In WO 97/04771 sind dagegen Benzimidazol-4-amide aufgeführt, die das PARP hemmen. Insbesondere sind Derivate dort als wirksam beschrieben, die einen Phenyl-Ring in 2-Stellung tragen, wobei der Phenyl-Ring noch mit einfachen Substituenten, wie Nitro, Methoxy und CF₃, 10 substituiert sein kann. Obwohl diese Substanzen zum Teil gute Hemmung des Enzyms PARP zeigen, haben die dort beschriebenen Derivate als Nachteil, daß sie nur wenig oder keine Löslichkeit in wäßrigen Lösungen zeigen und somit nicht als wäßrige Lösung appliziert werden können.

15

In einer Reihe von Therapien wie Schlaganfall werden die Wirkstoffe intravenös als Infusionslösung appliziert. Dazu ist es notwendig, Substanzen, hier PARP-Inhibitoren, zur Verfügung zu haben, die ausreichende Wasserlöslichkeit bei physiologischen 20 pH-Werten oder angenäherten pH-Werten (z.B. pH-Werten von 5 bis 8) aufweisen, so daß eine Infusionslösung hergestellt werden kann. Viele der beschriebenen PARP-Inhibitoren, insbesondere die besser wirksamen PARP-Inhibitoren, haben jedoch den Nachteil, daß sie nur geringe oder keine Wasserlöslichkeit 25 bei diesen pH-Werten zeigen und somit nicht für eine intravenöse Applikation in Frage kommen. Derartige Wirkstoffe können nur mit Hilfsstoffen, die die Wasserlöslichkeit vermitteln sollen, appliziert werden (vgl. WO 97/04771). Diese Hilfsstoffe, zum Beispiel Polyethylenglykol und Dimethylsulfoxid, verursachen 30 häufig Nebeneffekte oder sind sogar unverträglich. Gut wirksame PARP-Inhibitoren mit ausreichender Wasserlöslichkeit sind bisher nicht beschrieben worden.

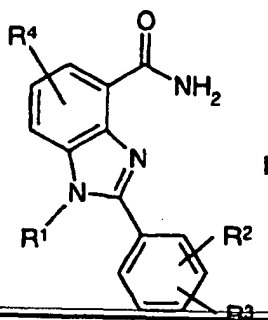
Es wurde überraschenderweise gefunden, daß 2-Phenyl-benz- 35 imidazole, die am Phenyl-Ring mit Alkoxy-Resten substituiert sind und an der Alkoxy-Seitenkette noch einen Amin-Rest tragen, gut wirksame Inhibitoren darstellen, die aber durch den Einbau des aliphatischen Amin-Restes eine Salzbildung mit Säuren ermöglichen und dadurch eine deutlich verbesserte Wasserlöslich- 40 keit zeigen.

In der vorliegenden Erfindung werden neue 2-Phenylbenzimidazol-Derivate der allgemeinen Formel I beschrieben, die gegenüber den bereits beschriebenen Verbindungen Vorteile zeigen und 45 potente PARP-Inhibitoren darstellen und zugleich auch aus-

reichende Wasserlöslichkeit zeigen, die eine Applikation als Infusionslösung ermöglicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind substituierte
5 2-Phenylbenzimidazole der allgemeinen Formel I:

10



15

worin

15 R^1 Wasserstoff, verzweigtes und unverzweigtes C_1 - C_6 -Alkyl, wobei
ein C-Atom des Alkyl-Restes noch OR^{11} oder eine Gruppe R^5
20 tragen kann, wobei

R^{11} Wasserstoff oder C_1 - C_4 -Alkyl bedeutet, und

25 R^2 Wasserstoff, Chlor, Fluor, Brom, Iod, verzweigtes und
unverzweigtes C_1 - C_6 -Alkyl, Nitro, CF_3 , CN, $NR^{21}R^{22}$, $NH-CO-R^{23}$,
 OR^{21} , wobei

R^{21} und R^{22} unabhängig voneinander Wasserstoff oder C_1 - C_4 -Alkyl
bedeuten und

30

R^{23} Wasserstoff, C_1 - C_4 -Alkyl oder Phenyl bedeuten, und

R^3 $-O-(CH_2)_o-(CHR^{31})_m-(CH_2)_n-R^5$, wobei

35 R^{31} Wasserstoff, C_1 - C_4 -Alkyl, OH und $O-C_1-C_4$ -Alkyl,

m, o unabhängig voneinander 0, 1 oder 2 bedeutet, und

n 1, 2, 3 oder 4 bedeutet, und

40

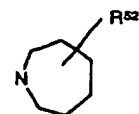
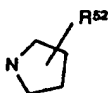
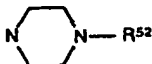
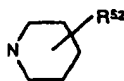
R^4 Wasserstoff, verzweigtes und unverzweigtes C_1 - C_6 -Alkyl, Chlor,
Brom Fluor, Nitro, Cyano, $NR^{41}R^{42}$, $NH-CO-R^{43}$, OR^{41} , wobei

R^{41} und R^{42} unabhängig voneinander Wasserstoff oder C_1 - C_4 -Alkyl
45 bedeuten und

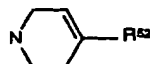
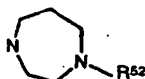
R⁴³ C₁-C₄-Alkyl oder Phenyl bedeuten, und

R⁵ NR⁵¹R⁵² oder einen der folgenden Reste

5



10



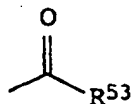
bedeutet, wobei

15

~~R⁵¹ Wasserstoff und verzweigtes und unverzweigtes C₁-C₆-Alkyl~~
bedeutet und

R⁵² Wasserstoff, verzweigtes und unverzweigtes C₁-C₆-Alkyl,
Phenyl,

20



, -SO₂R⁵³, worin

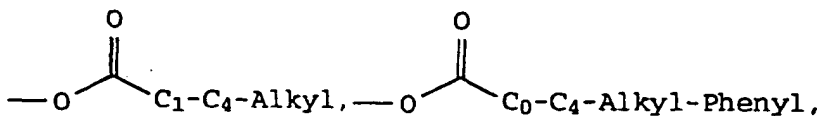
25

R⁵³ verzweigtes oder unverzweigtes O-C₁-C₆-Alkyl, Phenyl,
verzweigtes oder unverzweigtes C₁-C₄-Alkyl-Phenyl,
wobei bei R⁵² und R⁵³ unabhängig voneinander ein Wasserstoff
des C₁-C₆-Alkylrests durch einen der folgenden Reste substi-
tuiert sein kann: OH, O-C₁-C₄-Alkyl, Cyclohexyl, Cyclopentyl,
Tetrahydronaphthyl, Cyclopropyl, Cyclobutyl, Cycloheptyl,
Naphthyl und Phenyl, wobei die Carbocyclen der Reste R⁵² und

30

R⁵³ unabhängig voneinander noch einen oder zwei der folgenden
Reste tragen können: verzweigtes oder unverzweigtes
C₁-C₆-Alkyl, verzweigtes oder unverzweigtes O-C₁-C₄-Alkyl,
OH, F, Cl, Br, J, CF₃, NO₂, NH₂, CN, COOH, COOC₁-C₄-Alkyl,
C₁-C₄-Alkylamino, CCl₃, C₁-C₄-Dialkylamino, SO₂-C₁-C₄-Alkyl,
SO₂Phenyl, CONH₂, CONH-C₁-C₄-Alkyl, CONHPhenyl, CONH-C₁-C₄-
Alkyl-Phenyl, NHSO₂-C₁-C₄-Alkyl, NHSO₂Phenyl, S-C₁-C₄-Alkyl,

35



40

CHO, CH₂-O-C₁-C₄-Alkyl, -CH₂O-C₁-C₄-Alkyl-Phenyl, -CH₂OH,
-SO-C₁-C₄-Alkyl, -SO-C₁-C₄-Alkyl-Phenyl, -SO₂NH₂, -SO₂NH-
C₁-C₄-Alkyl

45

und zwei Reste eine Brücke -O-(CH₂)_{1,2}-O- bilden,
bedeuten kann,

sowie ihre tautomeren Formen, möglichen enantiomeren und diastereomeren Formen; deren Prodrugs, sowie mögliche physiologisch verträgliche Salze.

- 5 Bevorzugte Positionen für den Rest R^2 in der allgemeinen Formel I sind die 3-Position und die 4-Position zum Benzimidazolring. Für den Rest R^3 ist ebenfalls die 3-Position oder 4-Position zum Benzimidazolring bevorzugt.

- 10 Die bevorzugte Bedeutung von R^1 ist Wasserstoff.

Die bevorzugte Bedeutung von R^2 ist Wasserstoff, verzweigtes oder unverzweigtes C_1 - C_6 -Alkyl, Nitro, CN, NH_2 , O- C_1 - C_4 -Alkyl.

- 15 Die bevorzugte Bedeutung von R^3 ist $-O-(CH_2)_p-R^5$ mit p gleich 2, 3 oder 4.

R^5 bedeutet bevorzugt einen 6-gliedrigen Ring, insbesondere Piperazin,

20

R^{52} bedeutet bevorzugt einen gegebenenfalls substituierten Phenylring, insbesondere falls R^5 einen 6-gliedrigen Ring bedeutet.

- 25 Die bevorzugte Bedeutung von R^4 ist Wasserstoff.

Ganz besonders bevorzugt sind die jeweiligen Kombinationen der obigen bevorzugten Bedeutungen.

- 30 Die Verbindungen der Formel I können als Racemate, als enantiomerenreine Verbindungen oder als Diastereomere eingesetzt werden. Werden enantiomerenreine Verbindungen gewünscht, kann man diese beispielsweise dadurch erhalten, daß man mit einer geeigneten optisch aktiven Base oder Säure eine klassische Racematspaltung
- 35 mit den Verbindungen der Formel I oder ihren Zwischenprodukten durchführt.

Gegenstand der Erfindung sind auch zu Verbindungen der Formel I mesomere oder tautomere Verbindungen.

40

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind die physiologisch verträglichen Salze der Verbindungen I, die sich durch Umsatz von Verbindungen I mit einer geeigneten Säure oder Base erhalten lassen. Geeignete Säuren und Basen sind zum Beispiel in Fort-

- 45 schritte der Arzneimittelforschung, 1966, Birkhäuser Verlag, Bd. 10, S. 224-285, aufgelistet. Dazu zählen zum Beispiel Salzsäure, Citronensäure, Weinsäure, Milchsäure, Phosphorsäure.

10 Die Herstellung der erfindungsgemäßen 2-Phenylbenzimidazole I kann auf verschiedenen Wegen erfolgen, die im Syntheschema 1 skizziert wurde.

15



Dabei werden Hydroxy-benzaldehyde V mit R5 - L, wobei L eine Abgangsgruppe darstellt, unter Benutzung einer Base bei 25 bis 150°C gearbeitet, vornehmlich aber bei erhöhter Temperatur wie 60 bis 130°C, alkyliert, wobei ein Phenolether VI entsteht.

- 5 Dabei wird in Lösungsmitteln wie zum Beispiel Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid, Alkohole, z.B. Ethanol, Ketonen, z.B. Methyl-ethylketon, Aceton, aliphatischen Ethern, z.B. Tetrahydrofuran, und Kohlenwasserstoffen, z.B. Toluol, gearbeitet, wobei man auch Gemische einsetzen kann. Als Base können zum Beispiel Alkoholate, 10 z.B. Natriumethanolat und Kalium-tert.-butanolat, Karbonate, z.B. Kaliumkarbonat, Hydride, z.B. Natriumhydrid, und Hydroxide, z.B. Natriumhydroxid und Kaliumhydroxid, eingesetzt werden. Zudem kann man auch verschiedene Kronenether wie 18-crown-6 in katalytischen Mengen zugeben. ~~Weiterhin kann man unter Phasentransfer~~
-
- 15 bedingungen arbeiten (Methoden siehe R.C. Larock, Comprehensive Organic Transformations, 1989, S. 445f.). Als Abgangsgruppe L kann man Halogenide, z.B. Brom, Chlor und Iod, oder auch zum Beispiel Tolysate oder Mesylate einsetzen.
- 20 Durch Kondensation des Benzaldehyds mit Phenylendiaminen erhält man das Benzimidazol VII, wobei man bevorzugt in polaren Lösungsmitteln wie Ethanol oder Dimethylformamid und Zusatz von Säuren wie Essigsäure bei erhöhter Temperatur arbeitet, in der Regel 80 bis 120°C. Günstig für die Reaktion ist der Zusatz von 25 schwachen Oxidationsmitteln wie Kupfer-II-Salzen, die als wäßrige Lösung zugesetzt werden.

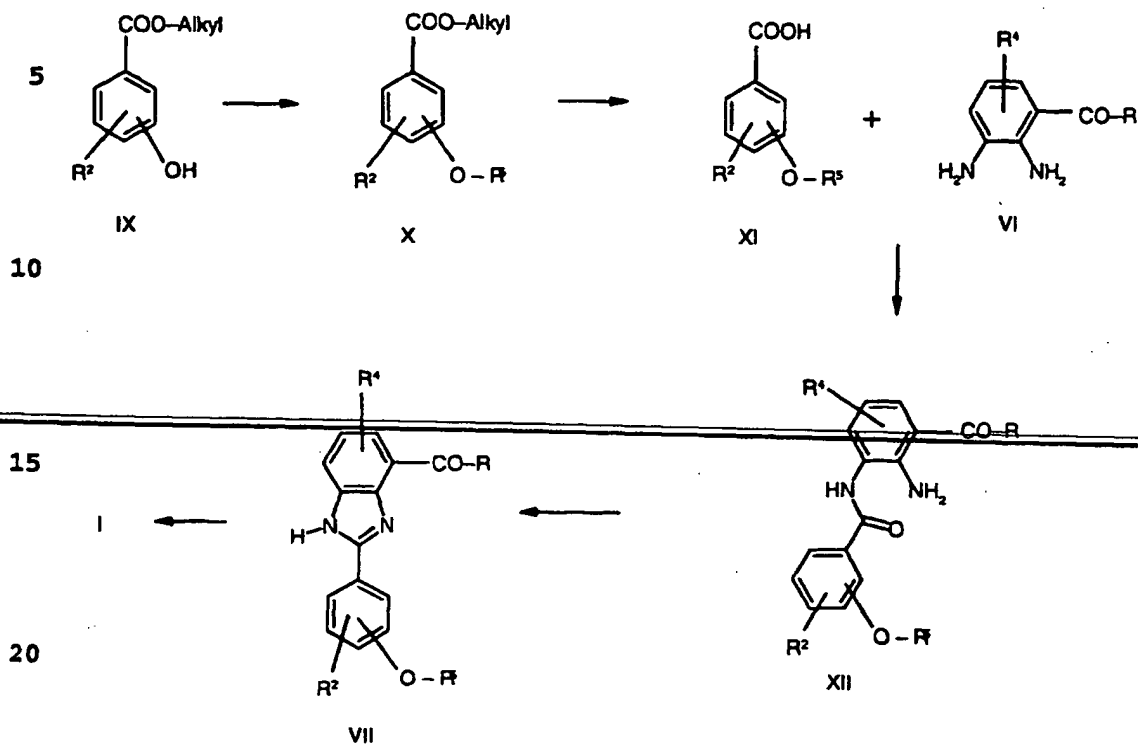
30

35

40

45

Syntheseschema 2



Wenn in dem Phenylendiamin VIII $R = NH_2$ ist, entstehen bei der
 25 Kondensation direkt erfindungsgemäße Verbindungen I. Ansonsten
 kann man, falls $R = O\text{-Alkyl}$ ist, diesen Ester mit Ammoniak, bei
 gegebenenfalls erhöhter Temperatur und erhöhtem Druck, zum Amid I
 umsetzen. Alternativ kann man den Ester VIII mit Hydrazin in
 polaren Lösungsmitteln, wie die Alkohole Butanol und Ethanol,
 30 oder auch Dimethylformamid, bei erhöhten Temperaturen, vorzugs-
 weise 80 bis 130°C, umsetzen, wobei ein Hydrazid VIII ($R = NHNH_2$)
 anfällt, das danach noch unter reduktiven Bedingungen, wie mit
 Raney-Nickel in Alkoholen unter Rückfluß, zum Amid I reduziert
 werden kann.

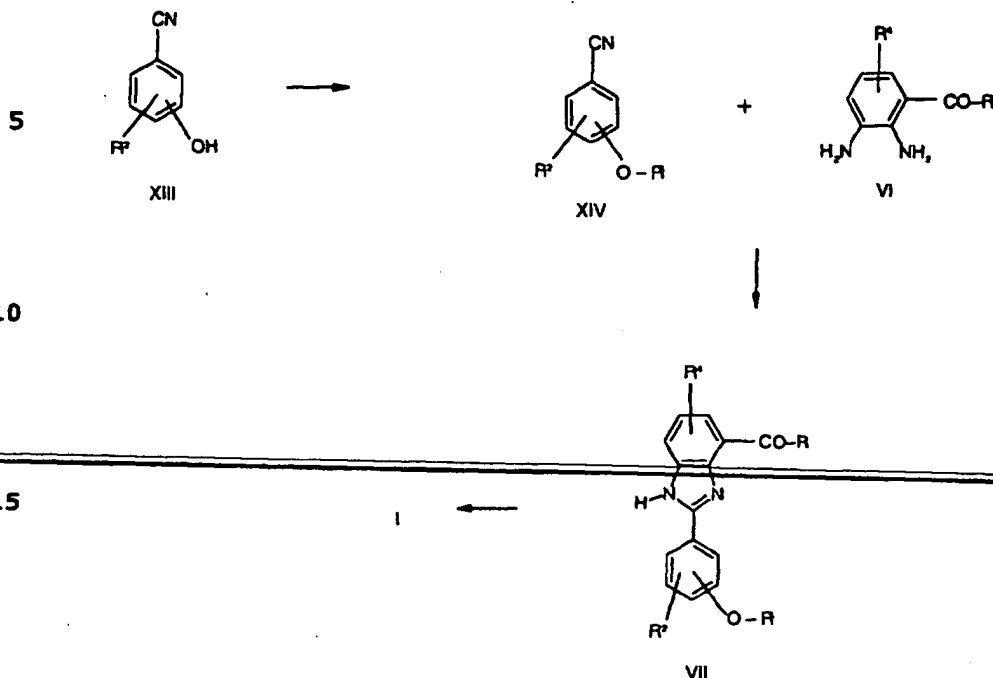
35

Eine Einführung des Restes R^1 am Benzimidazol-Rest in I ($R^1 = H$)
 gelingt unter Alkylierungsbedingungen wie oben (siehe V bis VI),
 wobei allerdings der Reaktionspartner $R^1\text{-L}$ ($L = \text{Abgangsgruppe}$
 wie oben) eingesetzt werden muß (siehe Schema 1).

40

45

Syntheseschema 3



Alternativ zu den im Schema 1 gezeigten Benzaldehyden VI kann man auch Benzoessäuren wie XI (siehe Schema 2) oder Benzonitrile wie XIV (siehe Schema 3) anstelle des Benzaldehyds einsetzen. Die Herstellung dieser Derivate erfolgt analog zur Herstellung der substituierten Benzaldehyde VI. Ausgehend von XI erfolgt die Kondensation zu VII in zwei Stufen. Zuerst wird die Benzoesäure XI mit dem Anilin VI in einer peptidartigen Kupplung zum Amid XII umgesetzt. Dabei arbeitet man nach üblichen Bedingungen, die zum Beispiel im Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, 4. Aufl., E5, Kap. V, bzw. C.R. Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publisher, 1989, Seite 972f., aufgelistet sind. Der Ringschluß zum Benzimidazol erfolgt danach bei erhöhter Temperatur, zum Beispiel 60 bis 180°C, mit oder ohne Lösungsmittel, wie Dimethylformamid, unter Zusatz von Säuren, wie Essigsäure, oder direkt in Essigsäure selbst.

Die Reaktion des Phenylendiamins VI mit einem Benzonitril XIV erfolgt ebenfalls unter üblichen Bedingungen. Dabei kann man in Lösungsmitteln, wie Dimethylformamid, unter Zusatz von Säuren bei erhöhter Temperatur, wie 60 bis 200°C, arbeiten. Allerdings kann man auch die üblichen Methoden zur Herstellung von Amidinen aus Benzonitrilen anwenden, wie sie in J. Amer. Chem. Soc. 1957, 427, und J. Org. Chem. 1987, 1017, beschrieben sind.

Die in der vorliegenden Erfindung enthaltenen substituierten 2-Phenylbenzimidazole I stellen Inhibitoren des Enzyms Poly-(ADP-ribose)polymerase oder PARP (EC 2.4.2.30) dar.

Die inhibitorische Wirkung der substituierten 2-Phenylbenzimidazole I wurde mit einem in der Literatur bereits bekannten Enzymtest ermittelt, wobei als Wirkmaßstab ein K_i -Wert ermittelt wurde. Die 2-Phenylbenzimidazole I wurden in dieser Weise auf
5 Hemmwirkung des Enzyms Poly(ADP-ribose)polymerase oder PARP (EC 2.4.2.30) gemessen.

Es besteht ein hoher Bedarf an PARP-Inhibitoren mit hohem inhibitorischen Potential ($K_i < 50$ nm) und guter Bioverfügbarkeit. Die
10 Identifizierung solcher Verbindungen als auch ihre Optimierung setzt ein schnelles, effizientes Assay-System zur Quantifizierung der Aktivität der Poly-(ADP-ribose)-polymerase voraus. Alle bislang verfügbaren Assay-Systeme basieren auf der Verwendung von

~~radioaktivem NAD als Substrat für PARP und der Quantifizierung~~
15 der in das Poly-(ADP-ribose) Polymer eingebauten Radioaktivität. So sind PARP-Assays unter Verwendung von [^{14}C]NAD in JBC 254:9, 3647-3651, 1979; Biochemical Pharmacology 44:5, 947-953, 1992; Analytical Biochemistry 195, 227, 1-13, 1995; JBC 267:3, 1569-1575, oder unter Verwendung von [$\alpha^{32}\text{P}$]NAD in Analytical
20 Biochemistry 195, 226-231, 1991; JBC 264:8, 4312-4317, 1989; Anti-Cancer Drug Design 10, 507-514, 1995, oder unter Verwendung von [^3H]NAD in JBC 253:18, 6459, 6466, 1978; Eur J Biochem, 102, 43-57, 1979; J Clinical Investigation 77, 1312-1320, 1986, beschrieben.

25 Diese Methoden sind sowohl aufwendig, in ihrem Durchsatz limitiert, als auch aufgrund der verwendeten Radioaktivität umwelttechnisch und arbeitssichertechnisch problematisch. Der Bedarf an schnellen, nicht-radioaktiven Assay-Systemen ist daher
30 hoch.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft also ein, homogen oder heterogen durchführbares, in vitro Nachweisverfahren für PARP-Inhibitoren, das dadurch gekennzeichnet, daß man

35

a) ein ungeträgertes oder geträgertes Poly-ADP-ribosylierbares Target mit einem Reaktionsgemisch inkubiert, umfassend

a1) ein PARP;

a2) einen PARP-Aktivator; und

40

a3) einen PARP-Inhibitor oder einen Analyten, in welchem man wenigstens einen PARP-Inhibitor vermutet;

b) die Poly-ADP-Ribosylierungsreaktion durchführt; und

c) die Poly-ADP-Ribosylierung des Target qualitativ oder quantitativ mit einem Anti-Poly(ADP-ribose)-Antikörper bestimmt.

45

Vorzugsweise wird das Nachweisverfahren so durchgeführt, daß man das PARP-Homologe mit dem PARP-Aktivator und dem PARP-Inhibitor oder einen Analyten, in welchem man wenigstens einen PARP-Inhibitor vermutet, vorinkubiert, wie z.B. etwa 1 bis 5 30 Minuten, bevor man die Poly-ADP-Ribosylierungsreaktion durchführt.

Nach Aktivierung durch DNS mit Einzelstrangbrüchen (erfindungsgemäß bezeichnet als "aktivierte DNS") poly-ADP-ribosyliert PARP 10 eine Vielzahl nukleärer Proteine in Gegenwart von NAD. Zu diesen Proteinen zählt zum einen PARP selber, aber auch Histone etc.

Das bei den Nachweisverfahren vorzugsweise verwendete Poly-ADP-ribosylierbare Target ist ein Histon-Protein in seiner

- 15 nativen Form oder ein davon abgeleitetes Poly-ADP-ribosylierbares Äquivalent. Beispielhaft wurde eine Histonpreparation der Firma Sigma verwendet (SIGMA, Katalog-Nr. H-7755; Histone Typ II-as aus Kalbsthymus Luck JM et al., J. Biol. Chem., 233, 1407 (1958), Satake K., et al., J. Biol. Chem., 235, 2801 (1960)).
- 20 Im Prinzip können alle Arten von Proteinen oder Teile von diesen verwendet werden, die einer Poly-ADP-ribosylierung durch PARP zugänglich sind. Dies sind bevorzugterweise nukleäre Proteine, z.B. Histone, DNA-Polymerase, Telomerase, PARP selber. Auch synthetische Peptide, die von den entsprechenden Proteinen
- 25 abgeleitet sind, können als Target fungieren.

Es können im ELISA Assay Histonmengen im Bereich von 0,1 µg/well bis 100 µg/well, bevorzugterweise 1 µg/well bis 10 µg/well, verwendet werden. Die PARP Enzymmengen liegen in einem Bereich von 30 0,2 pMol/well bis 2 nMol/well, bevorzugterweise von 2 pMol/well bis 200 pMol/well; wobei der Reaktionsansatz jeweils 100 µl/well ausmacht. Reduzierungen auf kleinere Wells und entsprechend kleinere Reaktionsvolumina sind möglich.

Beim HTRF Assay werden identische PARP-Mengen eingesetzt, die 35 Menge an Histon oder modifizierten Histonen liegt im Bereich von 2 ng/well bis 25 µg/well, bevorzugterweise 25 ng/well bis 2,5 µg/well; wobei der Reaktionsansatz jeweils 50 µl/well ausmacht. Reduzierungen auf kleinere Wells und entsprechend kleinere Reaktionsvolumina sind möglich.

40 Der erfindungsgemäß verwendete PARP-Aktivator ist vorzugsweise aktivierte DNA.

Als Aktivator können diverse Typen geschädigter DNA fungieren.

45 DNA Schädigungen können durch Verdaz mit DNAasen oder anderen DNA modifizierenden Enzymen (z.B. Restriktionsendonukleasen), durch Bestrahlung oder andere physikalische Methoden oder chemische

Behandlung der DNA erzielt werden. Ferner ist es möglich, mittels synthetischer Oligonukleotide die Situation einer DNA Schädigung gezielt zu simulieren. In den beispielhaft angegebenen Assays wurde aktivierte DNA aus Kalbsthymus (SIGMA, Prod.-Nr. D4522, 5 CAS: 91080-16-9, hergestellt nach der Methode von Aposhian und Kornberg unter Verwendung von Kalbsthymus DNA (SIGMA D-1501) und Deoxyribonuklease Typ I (D-4263). Aposhian HV und Kornberg A., J. Biol. Chem., 237, 519 (1962)). Verwendet wurde die aktivierte DNA in einem Konzentrationsbereich von 0,1-1000 µg/ml, bevor- 10 zugterweise von 1 bis 100 µg/ml, im Reaktionsschritt.

Die Poly-ADP-Ribosylierungsreaktion wird in den erfindungsgemäßen Verfahren durch Zugabe von NAD⁺ gestartet.

15 Die Konzentrationen von NAD lagen in einem Bereich von 0,1 µM bis 10 mM, bevorzugterweise von 10 µM bis 1 mM.

Gemäß der heterogen durchführbaren Variante obigen Verfahrens wird die Poly-ADP-Ribosylierung des geträgerten Target mit Anti- 20 Poly-(ADP-ribose)-Antikörper bestimmt. Dazu trennt man das Reaktionsgemisch vom geträgerten Target ab, wäscht und inkubiert mit dem Antikörper. Dieser Antikörper kann selbst markiert sein. Vorzugsweise verwendet man jedoch zum Nachweis von gebundenem Anti-Poly-(ADP-ribose)-Antikörper einen markierten sekundären Anti- 25 körper oder ein entsprechendes markiertes Antikörperfragment. Geeignete Markierungen sind z.B. Radiomarkierung, Chromophor- oder Fluorophormarkierung, Biotinylierung, Chemilumineszenzmarkierung, Markierung mit paramagnetischem Metall, oder insbesondere Enzymmarkierungen, wie z.B. mit Meerrettich-Peroxidase. 30 Entsprechende Nachweistechiken sind dem Fachmann allgemein bekannt.

Gemäß der homogen durchführbaren Variante obigen Verfahrens ist das nichtgeträgerte Target mit einem Akzeptor-Fluorophor 35 markiert. Bevorzugt verwendet man dazu als Target biotinyliertes Histon, wobei das Akzeptor-Fluorophor über Avidin oder Streptavidin an die Biotingruppen des Histons gekoppelt ist. Als Akzeptor-Fluorophor sind insbesondere Phycobiliproteine (z.B. Phycocyanine, Phycoerythrine) geeignet, z.B. R-Phycocyanin 40 (R-PC), Allophycocyanin (APC), R-Phycoerythrin (R-PE), C-Phycocyanin (C-PC), B-Phycoerythrin (B-PE) oder ihre Kombinationen untereinander oder mit Fluoreszenzfarbstoffen wie Cy5, Cy7 oder Texas Red (Tandem system) geeignet. (Thammapalerd N. et al., Southeast Asian Journal of Tropical 45 Medicine & Public Health. 27(2):297-303, 1996; Kronick M.N. et al. Clinical Chemistry. 29(9):1582-6, 1983; Hicks J.M., Human Pathology. 15(2):112-6, 1984). Bei dem hier verwendeten Farb-

stoff XL665 handelt es sich um ein quervernetztes Allophycocyanin (Glazer AN, Rev. Microbiol. 36:173 198 (1982); Kronick M.N., J. Imm. Meth. 92:1 13 (1986); MacColl R et al., Phycobilli-proteins, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. (1987); MacColl 5 R. et al., Arch. Biochem. Biophys. 208:1:42 48 (1981)).

Außerdem ist bevorzugt, bei dem homogenen Verfahren die Poly-ADP-Ribosylierung des nicht geträgerten Target mit Anti-Poly-(ADP-ribose)-Antikörper zu bestimmen, der mit einem Donor-Fluorophor 10 markiert ist, das zur Energieübertragung auf das Akzeptor-Fluorophor befähigt ist, wenn Donor und Akzeptor durch Bindung des markierten Antikörpers an das Poly-ADP-ribosylierte Histon in räumliche Nähe gelangen. Vorzugsweise verwendete man ein Europium-Kryptat als Donor-Fluorophor für den Anti-Poly-(ADP-ribose)-~~Antikörper~~ 15 Antikörper.

Neben den verwendeten Europium-Kryptat können auch weitere Verbindungen als potentielle Donor-Moleküle auftreten. Hierbei kann zum einen der Kryptatkäfig modifiziert werden. Auch Austausch des 20 Europiums gegen andere Seltenerd-Metalle, wie z.B. Terbium, sind denkbar. Entscheidend ist eine lange Lebensdauer der Fluoreszenz, die die Zeitverzögerung garantiert. (Lopez E. et al., Clin Chem 39/2, 196-201, 1993; US Patent 5,534,622).

25 Die oben beschriebenen Nachweisverfahren basieren auf dem Prinzip, daß die Aktivität von PARP mit der Menge der an den Histonen gebildeten ADP-ribose-Polymeren korreliert. Der hier beschriebene Assay ermöglicht die Quantifizierung der ADP-ribose Polymere mittels spezifischer Antikörper in Form eines ELISA- 30 und eines HTRF-(homogenous time-resolved fluorescence; homogene zeit-aufgelöste Fluoreszenz) Assays. Konkrete Ausführungsformen dieser beiden Tests sind in den folgenden Ausführungsbeispielen näher beschrieben.

35 Das entwickelte HTRF-Testsystem (HTRF = homogeneous time-resolved fluorescence) mißt die Bildung von Poly-(ADP-Ribose) an Histonen mittels spezifischer Antikörper. Im Unterschied zum ELISA wird dieser Test in homogener Phase ohne Separations- und Waschschritte durchgeführt. Dies ermöglicht einen höheren Proben- 40 durchsatz und eine geringere Fehleranfälligkeit. HTRF basiert auf dem "Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer" (FRET) zwischen zwei Fluorophoren. In einem FRET Assay kann ein angeregtes Donor-Fluorophor seine Energie auf ein Akzeptor-Fluorophor übertragen, wenn sich die beiden in einer räumlichen Nähe befinden. In der 45 HTRF-Technologie ist das Donor-Fluorophor ein Europium-Kryptat [(Eu)K] und der Akzeptor ist XL665, ein stabilisiertes Allophycocyanin. Das Europium-Kryptat basiert auf Arbeiten von

Jean Marie Lehn (Strasbourg). (Lopez E. et al., Clin Chem 39/2, 196-201, 1993; US Patent 5,534,622).

- In einem homogenen Assay sind alle Komponenten auch während der Messung anwesend. Während dies Vorteile bei der Assaydurchführung bringt (Schnelligkeit, Aufwand), müssen Störungen durch Assaykomponenten (Eigenfluoreszenz, Quenching durch Farbstoffe etc.) ausgeschlossen werden. HTRF schließt diese Störungen durch eine zeitverzögerte Messung bei zwei Wellenlängen (665 nm, 620 nm) aus. Die HTRF-Fluoreszenz hat eine sehr lange Abklingzeit und kann daher zeitverzögert gemessen werden. Jegliche interferierende, kurzlebige Hintergrundfluoreszenz (z.B. durch Assaykomponenten oder Inhibitoren der Substanzbank) stört hier nicht mehr. Darüber hinaus wird permanent bei zwei Wellenlängen gemessen, um "Quench Effekte" farbiger Substanzen zu kompensieren. HTRF Assays sind z.B. im 96- or 384-well Mikrotiterplattenformat realisierbar und werden mit einem "Discovery HTRF Microplate Analyzer" (Packard Instruments) ausgewertet.
- 20 Erfindungsgemäß werden außerdem die folgenden in vitro-Screeningverfahren auf Bindungspartner für PARP bereitgestellt.

Eine erste Variante wird so durchgeführt, daß man

- 25 a1) PARP an einem Träger immobilisiert;
- b1) das immobilisierte PARP-Homologe mit einem Analyten in Kontakt bringt, in welchem man wenigstens einen Bindungspartner vermutet; und
- c1) an das immobilisierte PARP gebundene Bestandteile des Analyten, gegebenenfalls nach einer Inkubationsphase,
- 30 bestimmt.

Gemäß einer zweiten Variante wird

- 35 a2) ein Analyt, welcher wenigstens einen möglichen Bindungspartner für PARP enthält, an einem Träger immobilisiert;
- b2) der immobilisierte Analyt mit wenigstens einem PARP in Kontakt gebracht, für welches man einen Bindungspartner sucht; und
- c3) der immobilisierte Analyt wird, gegebenenfalls nach einer
- 40 Inkubationsphase, auf die Bindung des PARP untersucht.

Testsysteme für die Bestimmung der von Aktivität von PARP2 und PARP3 und der Inhibitorischen Wirkung von Effektoren auf PARP1, PARP2 und PARP3.

a) Herstellung von Antikörpern gegen Poly-(ADP-ribose)

Als Antigen zur Generierung von Anti-Poly-(ADP-ribose) Antikörpern kann Poly-(ADP-ribose) verwendet werden. Die Herstellung von Anti-Poly-(ADP-ribose) Antikörpern ist in der Literatur beschrieben. (Kanai Y. et al. (1974) Biochem Biophys Res Comm 59:1, 300-306; Kawamatsu H. et al. (1984) Biochemistry 23, 3771-3777; Kanai Y et al. (1978) Immunology 34, 501-508).

10 Unter anderem wurden verwendet: Anti Poly-(ADP-ribose)-Antikörper (polyklonales Antiserum, Kaninchen), BIOMOL; Best.-Nr. SA-276. Anti Poly-(ADP-ribose)-Antikörper (monoklonal, Maus; Klon 10H; Hybriomaüberstand, affinitätsgereinigt).

15 Die Antiseren oder aus Hybridomakulturüberstand gewonnenen monoklonalen Antikörper wurden durch eine Protein-A-Affinitätschromatographie in der dem Fachmann geläufigen Weise aufgereinigt.

20 b) ELISA-Assay

Materialien:

ELISA Farbreagenz: TMB-Fertigmix SIGMA T-8540

25

Eine 96-well Mikrotiterplatte (FALCON Micro-Test IIIä Flexible Assay Plate, # 3912) wurde mit Histonen (SIGMA, H-7755) beschichtet. Histone wurden hierfür in Carbonatpuffer (0,05 M Na_2HCO_3 ; pH 9,4) in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gelöst. Die einzelnen

30 Wells der Mikrotiterplatte wurden mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit je 150 μl dieser Histone-Lösung inkubiert. Anschließend werden die Wells durch Zugabe von 150 μl einer 1%igen BSA-Lösung (SIGMA, A-7888) in Carbonatpuffer für 2 Stunden bei Raumtemperatur blockiert. Es folgen drei

35 Waschschrte mit Waschpuffer (0,05 % Tween10 in 1x PBS; PBS (Phosphate buffered saline; Gibco, Best.-Nr. 10010): 0,21 g/l KH_2PO_4 , 9 g/l NaCl, 0,726 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7,4). Waschschrte wurden durchweg mit einem Mikrotiterplatten-Waschgerät durchgeführt (Mikrotiterplatten-Wäscher "Columbus",

40 SLT-Labinstruments, Österreich).

Für die Enzymreaktion wurden eine Enzymreaktionslösung und eine Substratlösung jeweils als "Pre-Mix" benötigt. Die absolute Menge dieser Lösungen richtete sich nach der Anzahl der vorgesehenen

45 Test-Wells.

Zusammensetzung der Enzymreaktionslösung pro Well:

- 4 µl PARP-Reaktionspuffer (1 M Tris-HCl pH 8,0, 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT)
- 5 - 20 ng PARP (human oder bovin)
- 4 µl aktivierte DNA (1 mg/ml; SIGMA, D-4522)
- ad 40 µl H₂O

Zusammensetzung der Substrat-Lösung pro Well:

10

- 5 µl PARP-Reaktionspuffer (10x)
- 0,8 µl NAD-Lösung (10 mM, SIGMA N-1511)
- 44 µl H₂O

-
- 15 Inhibitoren wurden in 1x PARP-Reaktionspuffer gelöst. DMSO, das gelegentlich zum Lösen von Inhibitoren in höheren Konzentrationen verwendet wurde, war bis zu einer Endkonzentration von 2 % unproblematisch. Für die Enzymreaktion wurden 40 µl der Enzymreaktionslösung pro Well vorgelegt und mit 10 µl Inhibitor-Lösung
- 20 für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 50 µl Substrat-Lösung pro Well gestartet. Die Reaktion wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt und anschließend durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer gestoppt.
- 25 Als primäre Antikörper wurden spezifische Anti-Poly-(ADP-ribose) Antikörper in einer 1:5000 Verdünnung eingesetzt. Die Verdünnung erfolgte in Antikörper-Puffer (1 % BSA in PBS; 0,05 % Tween20). Die Inkubationszeit für den primären Antikörper betrug eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach anschließendem dreimaligem
- 30 Waschen mit Waschpuffer erfolgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper (Anti-Maus-IgG, Fab-Fragmente, Peroxidase gekoppelt, Boehringer Mannheim, Best.-Nr. 1500.686; Anti-Rabbit-IgG, Peroxidase gekoppelt, SIGMA, Best.-Nr. A-6154) in einer 1:10000 Verdünnung in Antikörper-
- 35 puffer. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer folgte die Farbreaktion unter Verwendung von 100 µl Farbreagenz (TMB-Fertigmix, SIGMA) pro Well für ca. 15 min. bei Raumtemperatur. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 100 µl 2M H₂SO₄ gestoppt. Danach wurde sofort im ELISA-Platten-Lesegerät ("Easy Reader"
- 40 EAR340AT, SLT-Labinstruments, Österreich) gemessen (450 nm gegen 620 nm).

Für die Ermittlung des K_i-Wertes eines Inhibitors wurden verschiedene Konzentrationen zur Erstellung einer Dosis-Wirkungs-

- 45 kurve herangezogen. Für eine bestimmte Inhibitorkonzentration werden 3fach-Werte erhoben. Arithmetische Mittelwerte werden mit Microsoft® Excel ermittelt. Die IC₅₀-Bestimmung erfolgt mit

der Microcal® Origin Software (Vers. 5.0) ("Sigmoidal Fit"). Umrechnung der so berechneten IC₅₀-Werte auf K_i-Werte erfolgte durch Verwendung von "Eich-Inhibitoren". Die "Eich-Inhibitoren" wurden bei jeder Analyse mitgemessen. Der K_i-Werte der "Eich-Inhibitoren" wurde im gleichen Testsystem durch Dixon-Diagramm Analyse in der dem Fachmann geläufigen Weise ermittelt.

b) HTRF-(Homogenous time-resolved fluorescence) Assay

- 10 Beim erfindungsgemäßen HTFR-PARP-Assay werden Histone als Zielproteine der Modifikation durch PARP indirekt mit einem XL665-Fluorophor markiert. Der Antikörper wird direkt mit einem Europium-Kryptat markiert. Befindet sich das XL665-Fluorophor in einer unmittelbaren räumlichen Nähe, die durch eine Bindung an
- 15 die Poly-(ADP-ribose) am Histon gewährleistet wird, dann ist eine Energieübertragung möglich. Die Emission bei 665 nm ist somit direkt proportional zu der Menge an gebundenem Antikörper, der wiederum der Poly-(ADP-ribose) Menge entspricht. Somit entspricht das gemessene Signal der PARP Aktivität. Die verwendeten
- 20 Materialien sind, wenn nicht ausdrücklich angegeben, identisch mit denen im ELISA Assay (s.o.) verwendeten.

- Histone wurden in Hepes-Puffer (50 mM, pH = 7,5) zu 3 mg/ml gelöst. Biotinylierung erfolgte mit Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce, # 21335T). Ein molares Verhältnis von 4 Biotin pro Histon wurde verwendet. Die Inkubationszeit betrug 90 Minuten (RT). Anschließend wurden die biotinylierten Histone über eine G25 SF HR10/10 Säule (Pharmacia, 17-0591-01) in Hepes Puffer (50 mM, pH = 7,0) aufgereinigt, um überschüssiges Biotinylierungsreagenz zu entfernen. Der Anti-Poly-(ADP-ribose)-Antikörper wurde mittels bifunktionaler Kopplungsreagenzien mit Europium-Kryptat markiert. (Lopez E. et al. Clin. Chem. 39/2, 196-201, 1993 US P 5,534,662) Die Reinigung erfolgte auf einer G25SF HR10/30 Säule. Ein molares Verhältnis von 3,1 Kryptaten pro Antikörper wurde erzielt. Die
- 35 Ausbeute betrug 25 %. Die Konjugate wurden in Gegenwart von 0,1 % BSA in Phosphatpuffer (0,1 M, pH = 7) bei -80°C gelagert.

Für die Enzymreaktion wurden pro Well zusammenpipettiert:

- 40 - 10 µl PARP-Lösung in PARP-HTRF-Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT) mit 20 ng PARP (human oder bovin)
- 10 µl aktivierte DNA in PARP-HTRF-Reaktionspuffer (50 µg/ml)
- 10 µl biotinylierte Histone in PARP-HTRF-Reaktionspuffer
- 45 (1,25 µM)
- 10 µl Inhibitor in PARP-HTRF-Reaktionspuffer

Diese Reagenzien wurden 2 Minuten vorinkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von

- 10 µl NAD-Lösung in PARP-HTRF-Reaktionspuffer (41 µM/ml)
- 5 gestartet wurde. Die Reaktionszeit betrug 30 Minuten bei Raumtemperatur.

Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von

- 10 - 10 µl PARP-Inhibitor (25 µM, $K_i = 10$ nM) in "Revelation"-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 7,2, 0,2 M KF, 0,05 % BSA)

gestoppt.

15 Danach wurden zugegeben:

- 10 µl EDTA-Lösung (SIGMA, E-7889, 0,5 M in H₂O)
- 100 µl Sa-XL665 (Packard Instruments) in "Revelation"-Puffer (15-31,25 nM)
- 20 - 50 µl Anti-PARP-Kryptat in "Revelation"-Puffer (1,6-3,3 nM).

Nach 30 Minuten (bis 4 Stunden) konnte dann gemessen werden. Die Messung erfolgte auf einem "Discovery HTRF Microplate Analyzer" (Packard Instruments). Die Berechnung der K_i -Werte erfolgte wie
25 beim ELISA Assay beschrieben.

Bestimmung des Wasserlöslichkeit

Eine zu messende Verbindung wird direkt in einem festgelegten
30 Volumen Wasser gelöst und die entstandene Lösung mit einer Natriumacetat-Lösung auf pH 5 bis 6 eingestellt, so daß die zu prüfende Konzentration des Wirkstoffs erreicht wird. Falls die Meßsubstanz nicht als wasserlösliches Salz vorliegt, wurde diese in möglichst wenig Dimethylsulfoxid gelöst und anschließend mit
35 Wasser verdünnt (Endkonzentration an Dimethylsulfoxid ≤ 1 %), wonach auch hier der pH-Wert noch eingestellt wurde. Der potente PARP-Inhibitor NU 1076 (WO 97/04771) zeigte hier eine Löslichkeit $< 0,01$ %, wogegen das erfindungsgemäße Beispiel 2 eine Löslichkeit $> 0,5$ % aufweist.

40

Die substituierten 2-Phenylbenzimidazole der allgemeinen Formeln I stellen Inhibitoren der Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) bzw. wie es auch genannt wird Poly(ADP-ribose)synthase (PARS) dar und können somit zur Behandlung und Prophylaxe von
45 Krankheiten, die mit einer erhöhten Enzymaktivität dieser Enzyme verbunden sind, dienen.

Die Verbindungen der Formeln I können zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Schädigungen nach Ischämien und zur Prophylaxe bei erwarteten Ischämien verschiedener Organe eingesetzt werden.

5

Die vorliegenden 2-Phenylbenzimidazole der allgemeinen Formel I können danach zur Behandlung und Prophylaxe von neurodegenerativen Krankheiten, die nach Ischämie, Trauma (Schädel-Hirntrauma), Massenblutungen, Subarachnoidal-Blutungen und Stroke

10 auftreten, und von neurodegenerativen Krankheiten, wie multipler Infarkt-Dementia, Alzheimer Krankheit, Huntington Krankheit und von Epilepsien, insbesondere von generalisierten epileptischen Anfällen, wie zum Beispiel Petit mal und tonisch-clonische ~~Anfälle und partiell epileptischen Anfällen, wie Temporal Lobe,~~

15 und komplex-partiellen Anfällen, und weiterhin zur Behandlung und Prophylaxe von Schädigungen des Herzens nach cardialen Ischämien und Schädigungen der Nieren nach renalen Ischämien, zum Beispiel der akuten Niereninsuffizienz, des akuten Nierenversagens oder von Schädigungen, die während und nach einer

20 Nierentransplantation auftreten, dienen. Weiterhin können die Verbindungen der allgemeinen Formel I zur Behandlung des akuten Myocardinfarkts und Schädigungen, die während und nach dessen medikamentöser Lyse auftreten (zum Beispiel mit TPA, Reteplase, Streptokinase oder mechanisch mit einem Laser oder Rotablator),

25 und von Mikroinfarkten während und nach Herzklappenersatz, Aneurysmenresektionen und Herztransplantationen dienen. Ebenfalls können die vorliegenden 2-Phenylbenzimidazole I zur Behandlung einer Revascularisation kritisch verengter Koronararterien, zum Beispiel bei der PCTA und Bypass-Operationen, und kritisch verengter peripherer Arterien, zum Beispiel Beinarterien, dienen. Zudem können die 2-Phenylbenzimidazole I bei der Chemotherapie von Tumoren und deren Metastasierung nützlich sein und zur Behandlung von Entzündungen und rheumatischen Erkrankungen, wie z.B. rheumatischer Arthritis, dienen.

35

Neue PARP-Inhibitoren können in relevanten pharmakologischen Modellen auf ihre therapeutische Wirksamkeit überprüft werden. Beispiele für einige geeignete Modelle sind dazu in Tabelle 1 aufgeführt.

40

45

Tabelle 1

	Krankheit	Modell	Literatur
5	Neurodegenerative Erkrankungen (Schlaganfall, Parkinson etc.)	NMDA-Exzitotoxizität in der Maus oder Ratte	
10	Schlaganfall	Permanente MCAO ("middle cerebral arterial occlusion")	Tokime T. et al., J. Cereb Blood Flow Metab, 18(9):991-7, 1998 Guegan C. Brain Research. Molecular Brain Research 55(1) 133-40, 1998
15		Transiente, fokale MCAO in ratte oder Maus	Eliasson MJB et al., Nat Med 1997, 3:1089-1095. Endres M. et al., J. Cereb Blood Flow Metab 1997, 17:1143-1151. Takahashi K. et al., J. Cereb Blood Flow Metab 1997, 17:1137-1142.
20			
25	Parkinsonsche Krankheit	MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-pyridin) Toxizität in der Maus/Ratte	Cosi C. et al., Brain Res., 1998 809(1):58-67. Cosi C. et al., Brain Res., 1996 729(2):264-9.
30	Herzinfarkt	Koronargefäß-Okklusion an Ratte, Schwein oder Kaninchen	Richard V. et al., Br. J. Pharmacol 1994, 113, 869-876. Thiemermann C. et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1997, 94(2):679-83. Zingarelli B. et al., Cardiovasc Res. 1997, 36(2):205-15.
35		Langendorffherzmodell an Ratte oder Kaninchen	Beschreibung siehe unten
40	Septischer Schock	Endotoxin Schock in der Ratte	Szabo C. et al., J. Clin Invest, 1997, 100(3):723-35.
45		Zymosan oder Carrageenan induziertes multiples Organversagen in Ratte oder Maus	Szabo C. et al. J. Exp Med. 1997, 186(7):1041-9. Cuzzocrea S. et al. Eur J. Pharmacol. 1998, 342(1):67-76.
45	Rheumatoide Arthritis	Adjuvant oder Collagen induzierte Arthritis in Ratte oder Maus	Szabo C. et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1998, 95(7):3867-72.

	Krankheit	Modell	Literatur
5	Diabetes	Streptozotocin und Alloxan induziert bzw. Obesity assoziiert	Uchigata Y. et al., Diabetes 1983, 32: 316-318. Masiello P. et al., Diabetologia 1985, 28: 683-686. Shimabukuro M. et al., J. Clin Invest 1997, 100: 290-295.
10	Krebs		Schlicker et al. 1999 75:1, 91-100

Die erfindungsgemäßen Arzneimittelzubereitungen enthalten neben
 15 den üblichen Arzneimittel-Hilfsstoffen eine therapeutisch wirksame Menge der Verbindungen I.

Für die lokale äußere Anwendung, zum Beispiel in Puder, Salben
 oder Sprays, können die Wirkstoffe in den üblichen Konzen-
 20 trationen enthalten sein. In der Regel sind die Wirkstoffe in einer Menge von 0,001 bis 1 Gew.-%, vorzugsweise 0,001 bis 0,1 Gew.-%, enthalten.

Bei der inneren Anwendung werden die Präparationen in Einzeldosen
 25 verabreicht. In einer Einzeldosis werden pro kg Körpergewicht 0,1 bis 100 mg gegeben. Die Zubereitungen können täglich in einer oder mehreren Dosierungen je nach Art und Schwere der Erkrankungen verabreicht werden.

Entsprechend der gewünschten Applikationsart enthalten die
 erfindungsgemäßen Arzneimittelzubereitungen neben dem Wirkstoff
 die üblichen Trägerstoffe und Verdünnungsmittel. Für die lokale
 äußere Anwendung können pharmazeutisch-technische Hilfsstoffe,
 wie Ethanol, Isopropanol, oxethyliertes Ricinusöl, oxethyliertes
 35 Hydriertes Ricinusöl, Polyacrylsäure, Polyethylenglykol, Polyethylenglykolestearat, ethoxylierte Fettalkohole, Paraffinöl, Vaseline und Wollfett, verwendet werden. Für die innere Anwendung eignen sich zum Beispiel Milchzucker, Propylenglykol, Ethanol, Stärke, Talk und Polyvinylpyrrolidon.

40 Ferner können Antioxidationsmittel wie Tocopherol und butyliertes Hydroxyanisol sowie butyliertes Hydroxytoluol, geschmacksverbessernde Zusatzstoffe, Stabilisierungs-, Emulgier- und Gleitmittel enthalten sein.

45

Die neben dem Wirkstoff in der Zubereitung enthaltenen Stoffe sowie die bei der Herstellung der pharmazeutischen Zubereitungen verwendeten Stoffe sind toxikologisch unbedenklich und mit dem jeweiligen Wirkstoff verträglich. Die Herstellung der Arznei-
5 mittelzubereitungen erfolgt in üblicher Weise, zum Beispiel durch Vermischung des Wirkstoffes mit anderen üblichen Trägerstoffen und Verdünnungsmitteln.

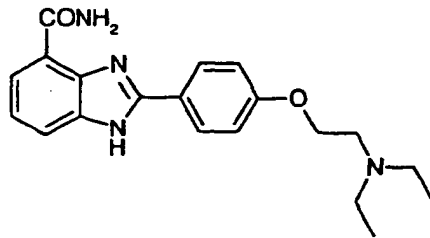
Die Arzneimittelzubereitungen können in verschiedenen
10 Applikationsweisen verabreicht werden, zum Beispiel peroral, parenteral wie intravenös durch Infusion, subkutan, intra-peritoneal und topisch. So sind Zubereitungsformen wie Tabletten, Emulsionen, Infusions- und Injektionslösungen, Pasten, Salben,
~~Gele, Cremes, Lotionen, Puder und Sprays möglich.~~

15

Beispiel 1

2 (4 (2-(N,N-Diethylamino)eth-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-
carbonsäureamid

20



25

a) 4 (2-(N,N-Diethylaminoeth-1-yloxy)-benzaldehyd

30

15 g (122 mMol) 4-Hydroxybenzaldehyd, 16,7 g (122 mMol) N(2-Chlorethyl)-N,N-diethylamin und 33,9 g (246 mMol) Kaliumkarbonat wurden zusammen mit einer Spatelspitze 18-Krone-6 in 300 ml Ethylmethylketon für 6 Stunden unter Rückfluß gekocht. Anschließend wurde filtriert und das Filtrat im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wurde zwischen Ether und 2M Natronlauge verteilt, die Ether-Phase abgetrennt, getrocknet und im
35 Vakuum eingeeengt. Man erhielt 24,8 g des Zwischenproduktes.

40

45

- b) 2(4(2-(N,N-Diethylamino)eth-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureethylester

5 2 g (11 mMol) 2,3-Diaminobenzoessäureethylester und 1,4 ml konzentrierte Essigsäure wurden in 25 ml Methanol gelöst. Anschließend wurden 3,2 g (14,4 mMol) der Zwischenverbindung 1a, gelöst in 50 ml Methanol, innerhalb von 30 Minuten zuge-
10 tropft. Danach wurden 2,9 g (14,4 mMol) Kupfer-II-acetat, gelöst in 37,5 ml warmen Wasser, zügig zugetropft und anschließend alles für 20 Minuten unter Rückfluß gekocht. Man kühlte die Reaktionslösung auf 50°C und gab 4,5 ml 32%iger Salzsäure zu. Danach tropfte man noch vorsichtig eine Lösung aus 4,3 g Natriumsulfid-Hydrat in 25 ml Wasser zu und rührte
~~alles noch für 15 Minuten. Die Reaktionslösung wurde auf~~
15 Eiswasser gegossen und der anfallende Niederschlag abgesaugt. Das Filtrat wurde mit wäßriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung alkalisch gestellt und mehrmals mit Essigester extrahiert. Die Essigester-Phase wurde abgetrennt, getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Man erhielt 4,4 g des Zwischenproduktes.

- 20 c) 2(4(2-(N,N-Diethylamino)eth-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäurehydrazid

25 Zu 4,1 g (10,7 mMol) der Zwischenverbindung 1b in 30 ml Ethanol wurden 2,7 g (54 mMol) Hydrazinhydrat gegeben und alles für 10 Stunden unter Rückfluß gekocht. Anschließend wurde das organische Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand zwischen Wasser und Essigester verteilt. Die Essig-
30 ester-Phase wurde abgetrennt, getrocknet und im Vakuum ein-geengt. Der so erhaltene Rückstand wurde noch mit Ether behandelt und erneut abgesaugt, wonach man 1,7 g der Zwischenverbindung erhielt.

- 35 d) 2(4(2-(N,N-Diethylamino)eth-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid

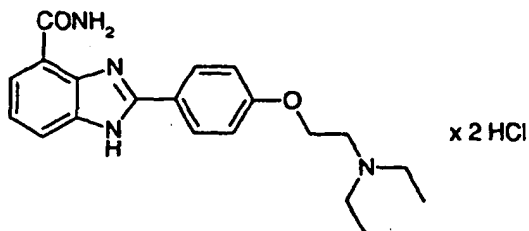
Zu 1,6 g (4,5 mMol) der Zwischenverbindung 1c in 45 ml Dimethylformamid/Wasser (2/1) wurden ca. 1,6 g Raney-Nickel gegeben und alles für 6 Stunden auf 100°C erwärmt. Anschlie-
40 ßend wurde das Reaktionsgemisch filtriert und das Filtrat mit viel Wasser verdünnt, wobei das Produkt ausfiel. Man erhielt 1,2 g des Produktes.

45 ¹H-NMR (D₆-DMSO). δ = 0,95 (6H), 2,6 (4H), 2,8 (2H), 4,1 (2H), 7,1 (2H), 7,3 (1H), 7,7 (1H + NH), 7,85 (1H), 8,2 (2H) und 9,4 (NH) ppm.

Beispiel 2

2(4(2-(N,N-Diethylamino)eth-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid x 2 Hydrochlorid

5



10

0,2 g des Produktes aus Beispiel 1 wurden in einem Gemisch aus Essigester und wenig Tetrahydrofuran gelöst und mit etherischer

15 Chlorwasserstoff-Lösung versetzt, wobei sich ein Niederschlag bildete. Dieser Niederschlag wurde abgesaugt, mit Aceton aufgeschlämmt und erneut abgesaugt, wonach man ca. 200 mg des Produktes erhielt.

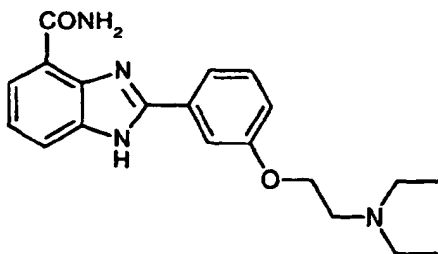
20 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_6\text{-DMSO}$). $\delta = 1,2$ (6H), 3,2 (4H), 3,3 (2H), 4,5 (2H), 7,25 (1H), 7,4 (1H), 7,8-7,9 (2H), 8,3 (2H), 9,0 (NH) und 10,5 (NH) ppm.

Beispiel 3

25

2(3(2-(N,N-Diethylamino)eth-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid

30



35

a) 3(2-(N,N-Diethylamino)eth-1-yloxy)-benzaldehyd

6,1 g (50 mMol) 3-Hydroxybenzaldehyd wurden in 100 ml Ethanol gelöst und 3,5 g (50 mMol) Natriumethanolat zugegeben. Man rührte alles für 15 Minuten. Danach wurden 7,5 g (55 mMol) N(2-Chlorethyl)-N,N-diethylamin zugefügt und alles für 12 Stunden unter Rückfluß gekocht. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wurde danach zwischen Ether und 1M Natronlauge verteilt, die Ether-Phase abgetrennt, getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Man erhielt 7,6 g des Zwischenproduktes.

- b) 2(3(2-(N,N-Diethylamino)eth-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureethylester

1 g (5,5 mMol) 2,3-Diaminobenzoessäureethylester und 0,68 ml konzentrierte Essigsäure wurden in 20 ml Methanol gelöst. Anschließend wurden 1,6 g (7,2 mMol) der Zwischenverbindung 3a, gelöst in 30 ml Methanol, innerhalb von 30 Minuten zugetropft. Danach wurden 1,1 g (5,5 mMol) Kupfer-II-acetat, gelöst in 19 ml warmen Wasser, zügig zugetropft und anschließend alles für 20 Minuten unter Rückfluß gekocht. Man kühlte die Reaktionslösung auf 50°C und gab 2,25 ml 32%iger Salzsäure zu. Danach tropfte man noch vorsichtig eine Lösung aus 2,13 g Natriumsulfid-Hydrat in 15 ml Wasser zu und rührte alles noch für 15 Minuten. Die Reaktionslösung wurde auf Eiswasser gegossen und der anfallende Niederschlag abgesaugt. Das Filtrat wurde mit wäßriger Natriumhydrogenkarbonat-Lösung alkalisch gestellt und mehrmals mit Essigester extrahiert. Die Essigester-Phase wurde abgetrennt, getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Man erhielt 2,4 g des Zwischenproduktes.

- c) 2(3(2-(N,N-Diethylamino)eth-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäurehydrazid

Zu 2,3 g (6,0 mMol) der Zwischenverbindung 3b in 30 ml Butanol wurden 1,5 g (30 mMol) Hydrazinhydrat gegeben und alles für 10 Stunden auf 120°C erwärmt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit viel Wasser verdünnt und mit Essigester extrahiert. Die Essigester-Phase wurde abgetrennt, getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Man erhielt 1,7 g der Zwischenverbindung.

- d) 2(3(2-(N,N-Diethylamino)eth-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid

Zu 1 g (2,7 mMol) der Zwischenverbindung 3c in 30 ml Dimethylformamid/Wasser (2/1) wurden ca. 1,5 g Raney-Nickel gegeben und alles für 6 Stunden auf 100°C erwärmt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch filtriert und das Filtrat mit viel Wasser verdünnt, wobei das Produkt ausfiel. Man erhielt 0,74 g des Produktes.

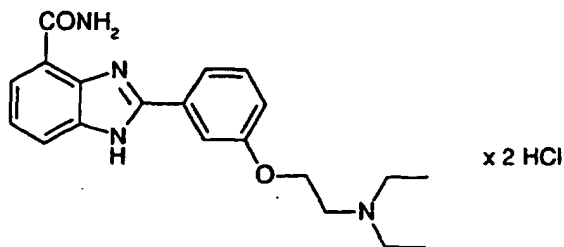
$^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_6\text{-DMSO}$). δ = 1,0 (6H), 2,6 (4H), 2,9 (2H), 4,15 (2H), 7,1 (1H), 7,4 (1H), 7,5 (1H), 7,7-7,9 (5H) und 9,3 (NH) ppm.

Beispiel 4

2(4(2-(N,N-Diethylamino)eth-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid x 2 Hydrochlorid

5

10



~~0,2 g des Produktes aus Beispiel 3 wurden in einem Gemisch aus~~
 15 Essigester und Tetrahydrofuran gelöst und mit etherischer Chlorwasserstoff-Lösung versetzt, wobei sich ein Niederschlag bildete. Dieser Niederschlag wurde abgesaugt, mit Aceton aufgeschlämmt und erneut abgesaugt, wonach man ca. 200 mg des Produktes erhielt.

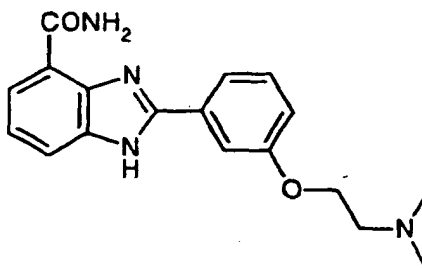
20 $^1\text{H-NMR}$ (D_6 -DMSO). $\delta = 1,3$ (6H), 3,2 (4H), 3,6 (2H), 4,6 (2H), 7,2-8,1 (8H), 9,0 (1H) und 10,8 (NH) ppm.

Analog dem Beispiel 1 wurden hergestellt:

25 Beispiel 5

2(3(2-(N,N-Dimethylamino)eth-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid

30



35

$^1\text{H-NMR}$ (D_6 -DMSO). $\delta = 2,2$ (6H), 2,7 (2H), 4,2 (2H), 7,0-8,0 (9H) und 9,3 (1H) ppm.

40

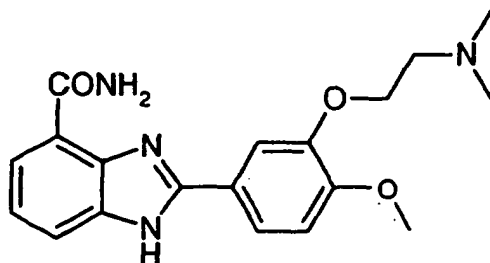
45

Beispiel 6

2(3(2-(N,N-Dimethylamino)eth-1-yloxy)-4-methoxy-phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid

5

10



$^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_6\text{-DMSO}$): $\delta = 2,25$ (6H), $2,75$ (2H), $3,8$ (3H), $4,1$ (2H), $7,0-8,1$ (8H) und $9,4$ (1H) ppm

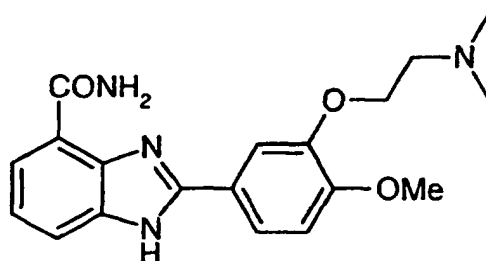
15

Beispiel 7

2(3(2-(N,N-Dimethylamino)eth-1-yloxy)-4-methoxy-phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid x 2 HCl

20

25



x 2 HCl

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O): $\delta = 3,0$ (6H), $3,7$ (2H), $3,8$ (3H), $4,3$ (2H), $6,9$ (1H), $7,3$ (1H), $7,3-7,5$ (3H) und $7,7$ (3H) ppm.

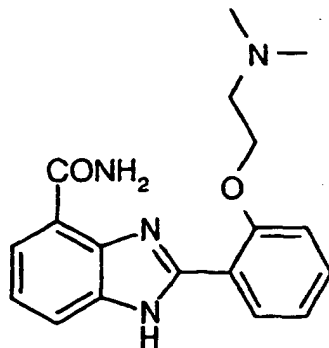
30

Beispiel 8

2(2(2-(N,N-Dimethylamino)eth-1-yloxy)-phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid x 2 HCl

35

40



x 2 HCl

45

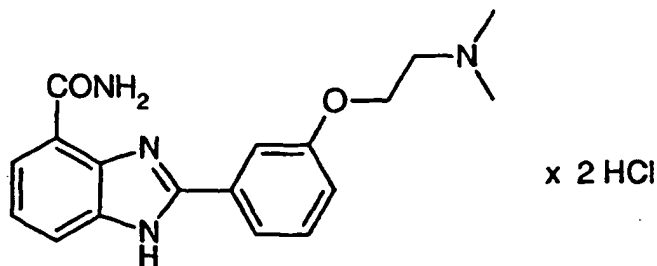
$^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_6\text{-DMSO}$): $\delta = 2,9$ (6H), $3,7$ (2H), $4,7$ (2H), $7,2-8,3$ (8H), $8,9$ (breit) und ca 11 (breit) ppm.

Beispiel 9

2(3(2-(N,N-Dimethylamino)eth-1-yloxy)-phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid x 2 Hydrochlorid

5

10



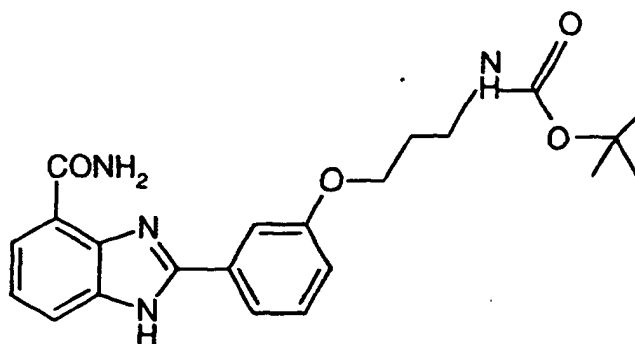
15 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_6\text{-DMSO}$): $\delta = 2,9$ (6H), $3,5$ (2H), $4,5$ (2H), $7,2\text{--}8,1$ (8H), $9,0$ (breit) und ca $10,8$ (breit) ppm.

Beispiel 10

20 2(3(3-(tert.-Butoxycarbonylamino)prop-1-yloxy)-phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid

25

30



$^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_6\text{-DMSO}$): $\delta = 1,3$ (9H), $1,9$ (2H), $3,1$ (2H), $4,1$ (2H), $6,9\text{--}8,0$ (9H) und ca $9,3$ (breit) ppm.

35

40

45

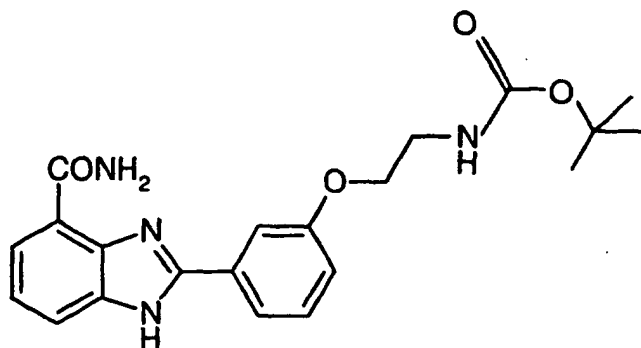
17.10.11.99

Beispiel 11

2(3(3-(tert.-Butoxycarbonylamino)eth-1-yloxy)-phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid

5

10



15

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_6\text{-DMSO}$): $\delta = 1,3$ (9H), 3,3 (2H), 4,1 (2H), 7,0-8,0 (9H) und ca 9,3 (breit) ppm.

Beispiel 12

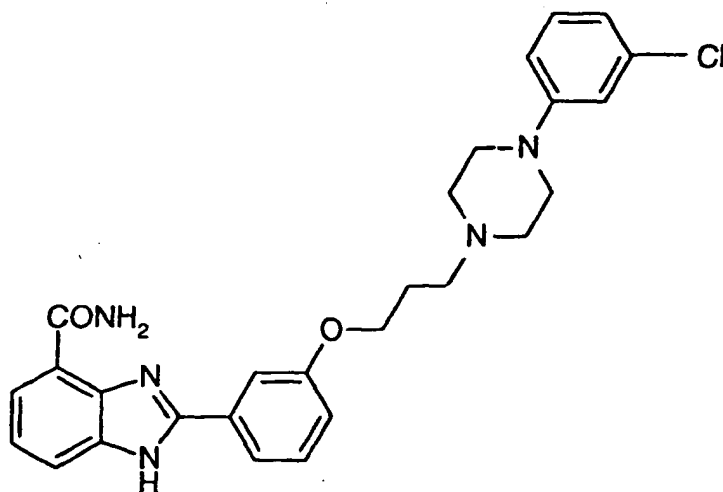
20

2(3(3-(4(3-Chlorphenyl)piperazin-1-yl)prop-1-yloxy)-phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid

25

30

35



$^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_6\text{-DMSO}$): $\delta = 2,3$ (2H), 3,3-3,5 (6H), 3,7 (2H), 3,7-4,3 (6H), 6,9-8,0 (11H), 9,1 (breit) und ca 10,9 (breit) ppm.

40

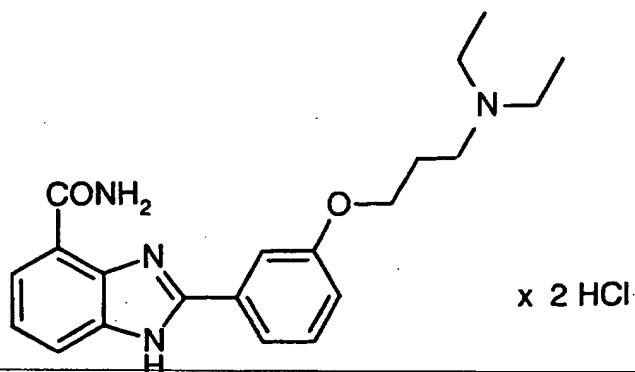
45

Beispiel 13

2(3(3-(N,N-Diethylamino)prop-1-yloxy)-phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid x 2 HCl

5

10



15

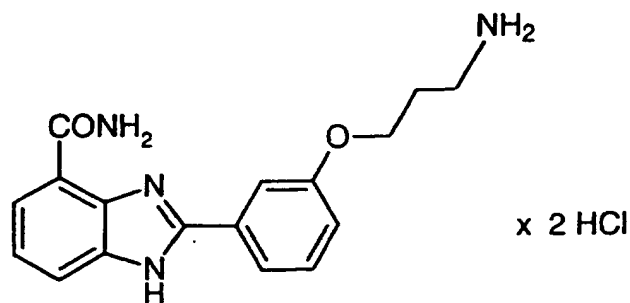
$^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_6\text{-DMSO}$): $\delta = 1,2$ (6H), $2,2$ (2H), $3,2$ (4H), $3,8$ (2H), $4,3$ (2H), $7,1-8,0$ (7H), $9,1$ (breit) und ca $10,5$ (breit) ppm.

Beispiel 14

20

2(3(3-Aminoprop-1-yloxy)-phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid x 2 HCl

25



30

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_6\text{-DMSO}$): $\delta = 2,1$ (2H), $3,0$ (2H), $4,2$ (2H), $7,2$ (1H), $7,5$ (2H), $7,8-8,1$ (6H), $8,2$ (breit) und ca $8,9$ (breit) ppm.

35

40

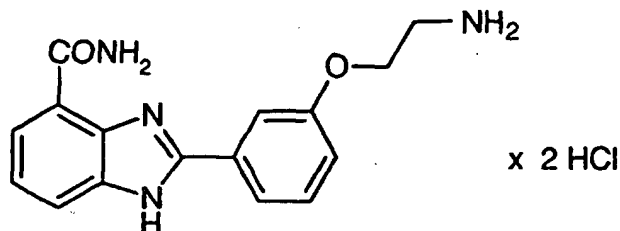
45

Beispiel 15

2(3(2-Aminoeth-1-yloxy)-phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid
x 2HCl

5

10



$^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_6\text{-DMSO}$): $\delta = 3,2$ (2H), $4,2$ (2H), $7,1-8,0$ (9H),
 ~~$8,2$ (breit) und $9,0$ (breit) ppm.~~

15

Folgende Beispiele können analog der obigen Vorschriften hergestellt werden:

2(4(2-(N,N-Dimethylamino)eth-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid

2(4(2-(1-Pyrrolidiny)eth-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid

2(3(2-(1-Pyrrolidiny)eth-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid

2(4(2-(1-Piperidiny)eth-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid

30

2(3(2-(1-Piperidiny)eth-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid

2(4(2-Amino)eth-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid

35

2(3(2-Amino)eth-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid

2(4(3-(N,N-Diethylamino)prop-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid

40

2(4(3-(N,N-Dimethylamino)prop-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid

2(3(3-(N,N-Diethylamino)prop-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid

45

2(4(3-(N,N-Dimethylamino)prop-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid

2(4(3-(1-Pyrrolidiny)prop-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-
5 carbonsäureamid

2(3(4-(1-Pyrrolidiny)prop-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid

10 2(4(3-(1-Piperidiny)prop-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid

2(3(3-(1-Piperidiny)prop-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid

15

2(4(3-(N,N-Ethyl-methylamino)prop-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid

2(3(3-(N,N-Ethyl-methylamino)prop-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-
20 4-carbonsäureamid

2(4(2-(N,N-Ethyl-methylamino)eth-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid

25 2(3(2-(N,N-Ethyl-methylamino)eth-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid

2(4(2-(N,N-Methyl-propylamino)eth-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid

30

2(3(2-(N,N-Methyl-propylamino)eth-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid

2(4(3-(N,N-Methyl-propylamino)prop-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-
35 4-carbonsäureamid

2(3(3-(N,N-Methyl-propylamino)prop-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid

40 2(4(2-(N-Methylamino)eth-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid

2(3(2-(N-Methylamino)eth-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid

45

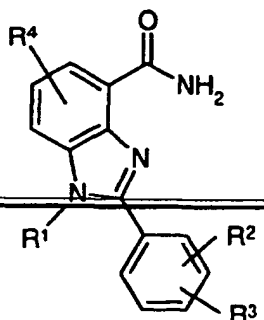
2(4(3-(N-Methylamino)prop-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid

Substituierte 2-Phenylbenzimidazole, deren Herstellung und Anwendung

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft neuartige 2-Phenylbenzimidazole der allgemeinen Formel I:

10



15

worin

20 R^1 Wasserstoff, verzweigtes und unverzweigtes C_1 - C_6 -Alkyl, wobei ein C-Atom des Alkyl-Restes noch OR^{11} oder eine Gruppe R^5 tragen kann, wobei

R^{11} Wasserstoff oder C_1 - C_4 -Alkyl bedeutet, und

25

R^2 Wasserstoff, Chlor, Fluor, Brom, Iod, verzweigtes und unverzweigtes C_1 - C_6 -Alkyl, Nitro, CF_3 , CN, $NR^{21}R^{22}$, $NH-CO-R^{23}$, OR^{21} , wobei

30 R^{21} und R^{22} unabhängig voneinander Wasserstoff oder C_1 - C_4 -Alkyl bedeuten, und

R^{23} Wasserstoff, C_1 - C_4 -Alkyl oder Phenyl bedeuten, und

35 R^3 $-O-(CH_2)_o-(CHR^{31})_m-(CH_2)_n-R^5$, wobei

R^{31} Wasserstoff, C_1 - C_4 -Alkyl, OH und $O-C_1$ - C_4 -Alkyl,

m, o unabhängig voneinander 0, 1 oder 2 bedeutet, und

40

n 1, 2, 3 oder 4 bedeutet, und

R^4 Wasserstoff, verzweigtes und unverzweigtes C_1 - C_6 -Alkyl, Chlor, Brom Fluor, Nitro, Cyano, $NR^{41}R^{42}$, $NH-CO-R^{43}$, OR^{41} , wobei

45

R^{41} und R^{42} unabhängig voneinander Wasserstoff oder C_1 - C_4 -Alkyl bedeuten, und

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.